

11.01.2005

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日      2 0 0 3 年 1 2 月    1 日  
Date of Application:

出 願 番 号      特 願 2 0 0 3 - 4 0 1 4 0 5  
Application Number:  
[ST. 10/C] :      [ J P 2 0 0 3 - 4 0 1 4 0 5 ]

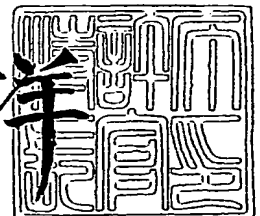
出      願      人      明 治 乳 業 株 式 会 社  
Applicant(s):

BEST AVAILABLE COPY

2 0 0 5 年    2 月 1 8 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川 洋



【書類名】 特許願  
【整理番号】 H15027  
【提出日】 平成15年12月 1日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社食品機能研究所  
                                内  
    【氏名】 殿内 秀和  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社食品機能研究所  
                                内  
    【氏名】 鈴木 匡之  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社食品機能研究所  
                                内  
    【氏名】 内田 勝幸  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社食品機能研究所  
                                内  
    【氏名】 小田 宗宏  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000006138  
    【住所又は居所】 東京都江東区新砂 1-2-20  
    【氏名又は名称】 明治乳業株式会社  
    【代表者】 浅野 茂太郎  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 059101  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項 1】

配列表の配列番号 1 のアミノ酸配列で示されるペプチド。

【請求項 2】

配列表の配列番号 2 のアミノ酸配列で示されるペプチド。

【請求項 3】

配列表の配列番号 3 のアミノ酸配列で示されるペプチド。

【請求項 4】

配列表の配列番号 1 ～ 3 のアミノ酸配列で示されるペプチドのうち少なくとも 1 つのペプチドを有効成分とする ACE 阻害剤。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】ACE阻害ペプチド

## 【技術分野】

【0001】

本発明は、アンジオテンシン変換酵素（ACE）阻害活性を有するペプチドに関するものである。

本発明に係るペプチドは、血圧降下剤として、医薬品用途に使用するほか、血圧が高い人用の特別用途食品、栄養食品、機能性食品、特定保健用食品、血圧降下作用を標榜可能な飲食品等として使用し、血圧上昇抑制のほか、高血圧の予防等に広く利用できるものである。

## 【背景技術】

【0002】

アンジオテンシン変換酵素（Angiotensin Converting Enzyme; ACE）は、血圧や体液量調節に重要な役割を果たしているタンパク質分解酵素で、血圧上昇を調節するレニン-アンジオテンシン系でアンジオテンシンIを強い昇圧作用のあるアンジオテンシンIIに変換する作用を有する。当該酵素の阻害剤は、血圧を低下させる作用があり、種々の薬剤が市販されている。また、カゼインやゼラチン、イワシ、カツオ等の様々な食品からACE阻害ペプチドが見出されている。例えば、カゼイン由来のペプチドVPP（Val-Pro-Pro, IC<sub>50</sub>値 9  $\mu$ M）、IPP（Ile-Pro-Pro, IC<sub>50</sub>値 5  $\mu$ M）、VAP（Val-Ala-Pro, IC<sub>50</sub>値 2  $\mu$ M）、トウモロコシタンパク質  $\alpha$ -ゼイン由来LQP（Leu-Gln-Pro, IC<sub>50</sub>値 2  $\mu$ M）が知られている（例えば非特許文献1～3などを参照）が他の配列からなる阻害剤が求められていた。

【非特許文献1】 Yasunori Nakamura, Naoyuki Yamamoto, Kumi Sakai, Akira Okubo, Sunao Yamazaki, Toshiaki Takano. Purification and Characterization of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitors from Sour Milk. Journal of Dairy Science Vol. 78 Page 777-783 (1995)

【非特許文献2】 Shinsuke Miyoshi, Hiromi Ishikawa, Toshiyuki Kaneko, Fumio Fukui, Hideoki Tanaka, Susumu Maruyama. Structures and Activity of Angiotensin-converting Enzyme Inhibitors in an  $\alpha$ -Zein Hydrolysate. Agricultural and Biological Chemistry Vol. 55 (5) Page 1313-1318 (1991)

【非特許文献3】 Susumu Maruyama, Hajime Mitachi, Hideaki Tanaka, Noboru Tomizawa, Hideo Suzuki. Studies on the Active Site and Antihypertensive Activity of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitors Derived from Casein. Agricultural and Biological Chemistry Vol. 51 (6) Page 1581-1586 (1987)

## 【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

上記のように、ACE阻害剤の研究、開発がさかんに行われている技術の現状に鑑み、本発明者らは、従来にない全く新規にして効果を有するACE阻害剤の開発を行うこととした。

【課題を解決するための手段】

【0004】

本発明者らは、上記課題を解決するために各方面から検討の結果、ペプチド、特にオリゴペプチドに着目して数多くのペプチドを合成し、得られたペプチドについてスクリーニングを行った。その結果、ACE阻害作用にすぐれたペプチドを3種類（ペプチドMAP, IHA及びペプチドIQA）を発見し、in vitro試験を行った結果、これらのペプチドが血圧降下剤として使用できることを確認して、本発明を完成した。

【0005】

本発明は、

- (1) 配列表の配列番号1のアミノ酸配列で示されるペプチド、
- (2) 配列表の配列番号2のアミノ酸配列で示されるペプチド、

(3) 配列表の配列番号3のアミノ酸配列で示されるペプチド、

(4) 配列表の配列番号1~3のアミノ酸配列で示されるペプチドのうち少なくとも1つのペプチドを有効成分とするACE阻害剤、  
に係るものである。

【発明の効果】

【0006】

本発明によれば、ACE阻害活性が高いので、少ない容量で血圧上昇抑制効果を発揮することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

本発明に係るペプチドMAP、IHA及びペプチドIQAは、それぞれ配列表の配列番号1、2及び3に示されるアミノ酸配列からなり、下記に示され、通常塩酸塩、酢酸塩、硫酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩等の工業上使用される塩を付加したペプチドであってもよい。

ペプチドMAP: (一文字表記の場合) MAP; Met-Ala-Pro (三文字表記の場合)

ペプチドIHA: (一文字表記の場合) IHA; Ile-His-Ala (三文字表記の場合)

ペプチドIQA: (一文字表記の場合) IQA; Ile-Gln-Ala (三文字表記の場合)

これらのペプチドは単独若しくは混合物で使用することができる。

【0008】

本発明のペプチドを調製するには、公知のペプチド合成法により製造出来るほか、カゼイン等の乳タンパク質を酵素的若しくは化学的加水分解によってもよい。

【0009】

すなわち本発明のACE阻害剤は、前記特定のペプチドを含んでおればよく、例えば医薬上許容される賦形剤等の添加物や食品用の添加物を添加して用いることが出来、その剤型は、固体状、液状であってもよい。投与経路も経口、注射等問わないが、経口摂取の場合、その使用量は症状、年齢、体重、投与方法および剤形等によって異なるが、通常は、成人に対して1日約0.1mg乃至1,500mgを投与することができる。

【0010】

本発明に係る有効成分は、毒性は全くないか又は極めて低く、卓越した安全性を示し、マウスに対して1日当り500mg経口投与したが急性毒性は全く認められなかった。したがって飲食品として使用する場合は、予防用、保健用、飲食品として使用する場合はいずれにおいても有効成分の使用量に格別の限定はなく、医薬として使用する場合でも、患者に応じて上記範囲内で適宜使用すればよい。また、本有効成分は多量に服用しても格別の急性毒性を示さないで、必要あれば上記範囲よりも多量に使用しても差し支えない。

【0011】

以下、本発明の実施例について述べる。

【実施例1】

【0012】

Denmark Skimチーズ (ミートチョパーにて粉碎) 100gと滅菌水50gを混合し、スターター菌18g (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus diacetylactis*の3種) および食塩0.34g添加し攪拌後、プロテアーゼN (天野エンザイム社製) を0.6g添加し、34℃で振透することにより分解を行った。48時間後、クエン酸にてpH 4.1に調製し、ウマミザイム (天野エンザイム社製) およびFlavourzyme (Novozymes社製) をそれぞれ0.3g添加し、34℃で振透することにより分解を行った。6日後、NaOHでpHを7.0に調整し、滅菌水を添加して200gにした。110℃で15分加熱して酵素を失活させた。遠心分離により不溶物を除去した後、HPLCによりペプチドの精製を行った。YMC-Pack R&D ODSカラム (YMC社製、20x250mm) を用いて0.1%トリフルオロ酢酸水溶液から0.1%トリフルオロ酢酸を含む70%アセトニトリル水溶液へのリニアグラジエント (50分) により溶出させた (流速7.5mL/分、検出214nm、カラム温度40℃)。HPLCクロマトグラムを図1に示す。27~31分に溶出したD画分を分取し、同様のカラムクロマトによる精製を行い、Met-Ala-Pro, Ile-His-Ala, Ile-Gln-Alaの配列を有するトリペプチドが単離された。

## 【実施例 2】

## 【0013】

ペプチド自動合成機を用いて配列番号 1 ~ 3 のペプチドをそれぞれ合成した。得られたペプチドの純度は、逆相HPLCで95%であることが、それぞれ確認された。これらの合成ペプチドを0.1Mホウ酸バッファ (pH 8.3) で溶解する。次に、酵素液 (Angiotensin Converting Enzyme: 2unit/ml) 0.1mlとサンプル溶液0.04mlを混合し、37℃に加温する。基質液 (Hippuryl-His-Leu; N-Benzoyl-Gly-His-Leu) 0.1mlを添加し、よく攪拌する。37℃で60分間反応させた後、1N塩酸を0.13ml添加して反応を停止させる。酢酸エチル0.85mlを加えて1分間振とうした後、3,000rpmで10分間遠心分離する。上清0.7mlを回収して遠心エバポレーターにて溶媒を除去する (約30分間)。蒸留水0.5mlを加えて残留物を溶解し、波長28nmにおける吸光度を測定する。

以下の数式 1 によりACE阻害活性 (%) を求めた。

## 【0014】

## 【数 1】

$$\text{阻害活性 (\%)} = \{ (A-B) - (C-D) \} / (A-B) \times 100$$

## 【0015】

ここで、式中Aは酵素を用いた場合における対照の吸光度、Bは酵素を用いなかった場合における対照の吸光度、Cは酵素を用いた場合におけるサンプルの吸光度、Dは酵素を用いなかった場合におけるサンプルの吸光度である。また、対照にはサンプル液の替わりに0.1Mホウ酸バッファを用いた。

## 【結果】

IC<sub>50</sub> 値

Met-Ala-Pro . . . 0.8 μM

Ile-His-Ala . . . 394.3 μM

Ile-Gln-Ala . . . 64.1 μM

## 【0016】

上記結果から明らかなように、3種類のペプチドは、いずれも、高いACE阻害作用を発現することが世界に先駆けて確認された。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0017】

本発明によれば、ACE阻害活性がきわめて高いので、血圧上昇抑制のための予防ないし治療剤として有用であるだけでなく、強い苦味等不快な風味も認められず、血圧上昇抑制用の予防ないし治療用飲食品としても利用することができる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0018】

【図 1】 チーズ由来ペプチドのHPLCクロマトグラムを示す。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Meiji Dairies Corporation

<120> Angiotensin Converting Enzyme Inhibitory Peptides

<130> H15027

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor  
y Peptide

<400> 1

Met Ala Pro

1

<210> 2

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor  
y Peptide

<400> 2

Ile His Ala

1

<210> 3

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

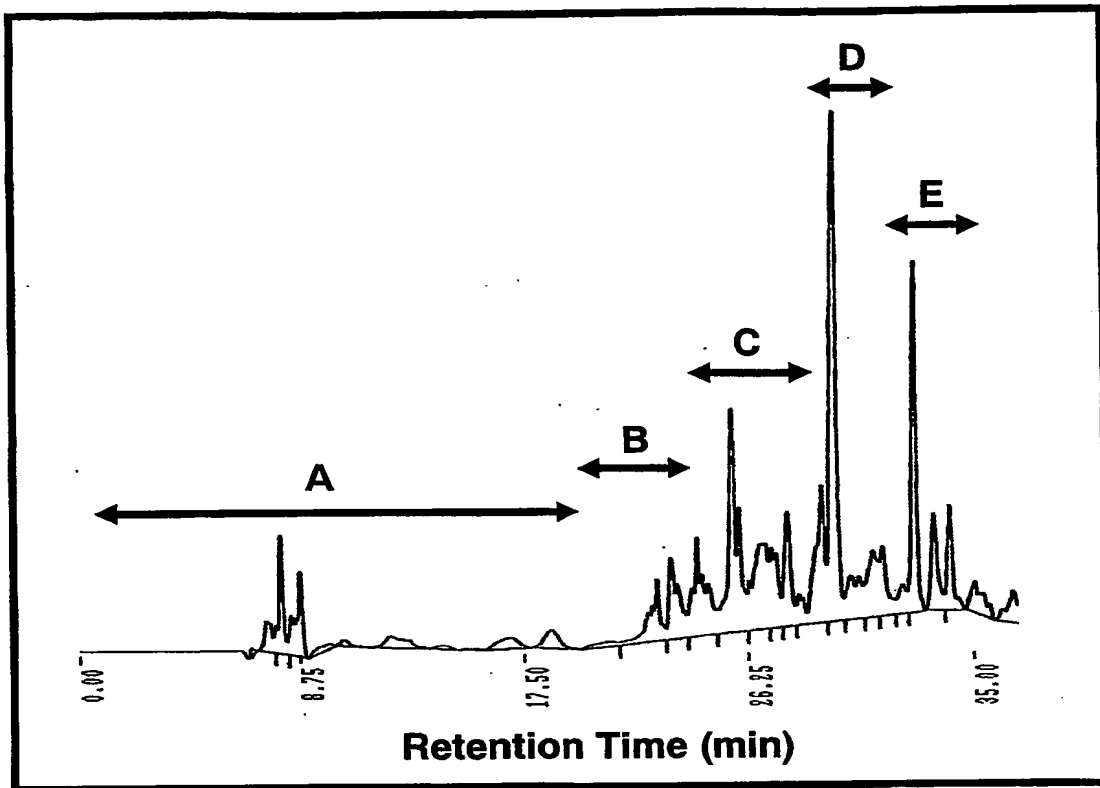
<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor  
y Peptide

<400> 3  
Ile Gln Ala  
1



【書類名】 図面  
【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 ペプチドMAP, IHA及びペプチドIQAを有効成分とするACE阻害剤。

【効果】 これらのペプチドは、安全性に優れ、その上ACE阻害効果が高いことが確認され、本発明は優れた血圧上昇抑制用の飲食品及び／又は医薬品を提供するものである。

【選択図】 なし

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-401405
受付番号	50301976292
書類名	特許願
担当官	金井 邦仁 3072
作成日	平成 15 年 12 月 2 日

## &lt; 認定情報・付加情報 &gt;

【特許出願人】	申請人
【識別番号】	000006138
【住所又は居所】	東京都江東区新砂 1 丁目 2 番 10 号
【氏名又は名称】	明治乳業株式会社

特願 2003-401405

出願人履歴情報

識別番号

[000006138]

1. 変更年月日

2001年10月 2日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都江東区新砂1丁目2番10号

氏 名

明治乳業株式会社

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/018235

International filing date: 01 December 2004 (01.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2003-401405  
Filing date: 01 December 2003 (01.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 03 March 2005 (03.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record.**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**